

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08066189 A**(43) Date of publication of application: **12 . 03 . 96**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
// C12N 9/88
(C12N 15/09 , C12R 1:13) , (C12N
9/88 , C12R 1:13)

(21) Application number: **06206883**(22) Date of filing: **31 . 08 . 94**(71) Applicant: **mitsubishi chem corp**

(72) Inventor: **KURIHARA MAYO**
INUI MASAYUKI
UCHIDA KOICHI
KOBAYASHI MIKI
YUGAWA HIDEAKI

(54) NEW DNA FRAGMENT

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a new DNA fragment containing a gene coding for phosphoenolpyruvic acid carboxylase derived from *Brevibacterium flavum* MJ-233, and capable of giving the enzyme enabling amino acids, etc., to be efficiently produced through genetic engineering technique.

CONSTITUTION: This new DNA fragment is derived from *Brevibacterium flavum* MJ-223 (FERM BP-1497), having an amino acid sequence containing an amino acid sequence of the formula, containing a gene coding for phosphoenolpyruvic acid carboxylase (PEPC) involving the production of useful substances such as amino acids and carbon dioxide fixation, and being capable of improving the production efficiency for useful substances such as amino acid, etc., by its transfection into a manifestation vector to transform a host cell to effect manifestation. This DNA fragment is obtained by extracting the whole DNA of *Brevibacterium flavum* MJ-223 followed by treating the whole DNA with a restriction enzyme, linking to a cloning vector, and then cloning by a conventional method.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

```

ATG ACT GAT TTT TTA CCC GAT GAC ATC AGG TTC CTC GGT CGA ATC CTC  48
Met Thr Asp Phe Leu Arg Asp Asp Ile Arg Phe Leu Gly Arg Ile Leu
      1           5           10           15
GGT GAG GTA ATT GCG GAA CAA GAA GCG CAG GAG GTT TAT GAA CTG GTC  96
Gly Glu Val Ile Ala Glu Gln Glu Gly Gln Glu Val Tyr Gln Leu Val
      20           25           30
      |
AGC GAG CAA CTG TCC GGC AAT ATT CAG CTG ACA ATG AAC GGT CTT TCC 2736
Ser Glu Glu Val Ser Arg Asp Ile Gln Leu Thr Met Asn Gly Leu Ser
      900           905           910
ACT GCA CTG GCG AAC TCC GCG TAC 2760
Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly Asn
      915           920

```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-66189

(43) 公開日 平成8年(1996)3月12日

| | | | | |
|---------------------------|-------|---------|-------------------------------|---------|
| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | | | |
| // C 1 2 N 9/88 | | | | |
| (C 1 2 N 15/09 | Z N A | 9281-4B | C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A |
| | | | (C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A |
| | | | 審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12 頁) | 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願平6-206883

(22) 出願日 平成6年(1994)8月31日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 栗原 真代

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 乾 将行

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 内田 康一

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 山本 隆也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規DNA断片

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の提供。

【構成】 大きさが約3.3 kbであり、両末端にSal

I部位を有し、下記表に記載の制限酵素で切断した場合、下記表に記載する認識部位数と切断断片の大きさを示すプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

| 制限酵素 | 認識部位数 | 切断断片の大きさ (kb) |
|--------|-------|---------------|
| Aat II | 1 | 1.0、2.3 |
| Acc I | 1 | 0.5、2.8 |
| Cla I | 2 | 0.9、1.0、1.4 |
| Nco I | 2 | 0.7、1.2、1.4 |

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

*

| 制限酵素 | 認識部位数 | 切断断片の大きさ (k b) |
|----------|-------|----------------|
| Aa t I I | 1 | 1. 0、2. 3 |
| A c c I | 1 | 0. 5、2. 8 |
| C l a I | 2 | 0. 9、1. 0、1. 4 |
| N c o I | 2 | 0. 7、1. 2、1. 4 |

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で示されるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項4】 配列表の配列番号1に記載の塩基配列で示されるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (Phosphoenolpyruvate carboxylase) (EC 4. 1. 1. 31) をコードする遺伝子 (以下これを「p p c 遺伝子」と略称することがある) を含むDNA断片に関する。

【0002】

【従来の技術】 p p c 遺伝子産物であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (以下これを「PEPC」と略称することがある) は、解糖系の代謝中間化合物であるホスホエノールピルビン酸に二酸化炭素 (重炭酸イオン) を固定してオギザロ酢酸を生成し、トリカルボン酸 (TCA) サイクルに4炭素 (C4) 化合物を補充する生理的役割を果たすとされている。TCAサイクルはアミノ酸等各種有用物質生成系において重要な代謝経路である。該遺伝子を利用することにより、TCAサイクルへの物質供給が強化され、アミノ酸等の有用物質生産量の増強、菌体収率の向上等が期待される。また、二酸化炭素を有機化合物へ固定する触媒機能を有することから、地球環境保全への寄与も期待できる。

【0003】 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは大部分の細菌、原生動物、すべての植物において存在が確認されている。該酵素をコードする遺伝子に関しては、高等植物に関し多数研究されているものの、細菌に関しては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [ジャーナル・オブ・バイケミストリー (J. Biochem.)、95、909 ~ 916 (1984) 参照] 及びコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来の遺伝子 [ジーン (Gene)、77、237 ~ 251 (1989)] が単離されているのみである。エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) に関しては、該酵素の反応

* 【請求項2】 大きさが約3. 3 k bであり、両末端に S a l I 部位を有し、下記表に記載の制限酵素で切断した場合、下記表に記載する認識部位数と切断断片の大きさを示す請求項1に記載のDNA断片。

機構等の基礎的研究は精力的に行われているものの、工業的観点からの利用については殆ど検討されていない。さらに産業上重要な細菌であるプレビバクテリウム属細菌を含むコリネ型細菌由来の p p c 遺伝子に関する基礎的研究、工業的応用検討は未だ十分でなく、解明すべき諸種の課題が山積している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、産業上重要な細菌であるプレビバクテリウム属細菌が有する p p c 遺伝子の単離および工業的応用を目的とし、鋭意研究を重ねた結果、ある種のプレビバクテリウム属に属する細菌から p p c 遺伝子が単離可能であることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0005】

【課題を解決するための手段】 かくして本発明によれば、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片が提供される。

【0006】 以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子 (p p c 遺伝子) を含むDNA断片」とは、ホスホエノールピルビン酸に二酸化炭素を固定化しオギザロ酢酸を生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片を意味するものである。

【0007】 本発明の p p c 遺伝子を含むDNA断片は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はプレビバクテリウム属細菌からクローニングされ、その供給源となるプレビバクテリウム属細菌として、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 由来のものが好適である。この供給源細菌から p p c 遺伝子を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである。

【0008】 p p c 遺伝子は、上記プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体の中から、以下に述べる方法で分離・取得することができる。まず、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えば S a l I を

20

30

40

50

用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0009】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpUC118（宝酒造製）に挿入し、このベクターを用いてエシェリヒア・コリJM109（宝酒造製）を形質転換し、形質転換体を取得する。得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、エシェリヒア・コリ由来のppc遺伝子〔ジャーナル・オブ・バイケミストリー（J. Biochem. ）、95、909～916（1984）参照〕及びトウモロコシ由来のppc遺伝子〔プラント・モレキュラー・バイオロジー（Plant Mol. Biol. ）、12、579～589（1989）〕の共通領域配列をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションにより、挿入*

10

第1表

| 制限酵素 | 認識部位数 | 切断断片の大きさ (kb) |
|-------|-------|---------------|
| AatII | 1 | 1.0、2.3 |
| AccI | 1 | 0.5、2.8 |
| ClaI | 2 | 0.9、1.0、1.4 |
| NcoI | 2 | 0.7、1.2、1.4 |

【0012】尚、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片またはプラスミドを制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動及び4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0013】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダ・ファージ（λ phage）のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ（φX174 phage）のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片またはプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。尚、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0014】一方、上記のプレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素SalIで切断することにより得られる大きさが約3.3kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118ベクター（宝酒造製）を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法〔dideoxy chain termination 法 Sanger F. et al.、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・

50

*されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株由来のppc遺伝子を確認することができる。

【0010】上記ppc遺伝子を含むDNA断片の一つとしては、前記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素SalIで完全分解することによって得られる、大きさが約3.3kbのDNA断片が挙げられる。この約3.3kbのDNA断片を各種制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。

【0011】

【表1】

ステイツ・オブ・アメリカ（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）、74、5463、（1977）〕により決定することができる。このようにして決定した上記約3.3kbのDNA断片中の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したppc遺伝子は、後記配列表の配列番号1に示す配列を有するものであり、920個のアミノ酸をコードする2760塩基対から構成される。

【0015】上記の塩基配列を包含する本発明のppc遺伝子を含むDNA断片は、天然のプレバクテリウム属コリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製394 DNA/RNAシンセサイザーを用いて合成されたものであってもよい。

【0016】また、前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のppc遺伝子を含むDNA断片は、PEPCの機能を実質的に損なうことがない限り塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく、又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のDNA断片に包含されるものである。

【0017】本発明のppc遺伝子DNAを含むDNA断片は、適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でPEPCの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。ここで、上記組み換えプラスミドにおいて、ppc遺伝子を発現させるためのプロモーターはプレバクテリウム属細菌が保有するプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、ppc

遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであっても良い。

【0018】本発明のppc遺伝子を導入することができるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むものであれば特に制限されない。その具体例としては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号公報に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11等を挙げることができる。

【0019】それらの中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とを有するものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX等が好適に使用される。

【0020】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレビバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片 (複製領域) を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片 (安定化領域) を切り出す。これらの両DNA断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI-KpnI部位及びSalI部位にそれぞれ組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0021】プラスミドpCRY30への本発明のppc遺伝子を含むDNA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素XhoIで開裂させ、そこに前記ppc遺伝子を含むDNA断片をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約3.3 kbのppc遺伝子を含むDNA断片が導入された組換えプラスミドをpCRY30-ppcと命名した。プ

ラスミドpCRY30-ppcの作製方法の詳細については、後記実施例で説明する。

【0022】本発明の組換えプラスミドで形質転換し得る宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERMBP-1498)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0023】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746；プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020；プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869；コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0024】尚、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [バクテリオロジカル・レビュー (Bact. Rev.)、36、361~40 (1972) 参照]。

【0025】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.)、170、2796 (1988)；アグリカルチャル・バイオロジカル・ケミストリー (Agric. Biol. Chem.)、52、293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [ジャーナル・オブ・インダストリアル・マイクロバイオロジー (J. Indust. Microbiol.)、5、159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0026】上記の方法で形質転換して得られるコリネ型細菌は、PEPC産生能を有しており、該コリネ型細菌を、それ自体既知の通常用いられる培地で培養することにより、PEPCを高含有する菌体を得ることができる。

【0027】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施

例により更に具体的に説明する。しかしながら、実施例は本発明の具体的な認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲を限定するためのものではないことを理解すべきである。

【0028】実施例1 プレバクテリウム・フラバム MJ-233株由来のppc遺伝子を含むDNA断片のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバム MJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地11〔組成：尿素 2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、K₂HPO₄ 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g、FeSO₄・7H₂O 6mg、MnSO₄・4~6H₂O 6mg、酵母エキス 2.5g、カザミノ酸 5g、ビオチン 200μg、塩酸チアミン 200μg、グルコース 20g、蒸留水 11〕に、プレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) を白金耳を用いて植菌し、対数増殖期後期まで33℃で振盪培養し、菌体を集めた。

【0029】得られた菌体を10mg/mlの濃度になるよう、10mg/ml リゾチーム、10mM NaCl、20mM トリス緩衝液 (pH8.0) 及び1mM EDTA・2Naの各成分を含有する溶液15ml (各成分の濃度は最終濃度である) に懸濁した。次にプロテナーゼKを最終濃度が100μg/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000×g、20分間、10~12℃) し、上清画分を分取した。この上清に酢酸ナトリウムを0.3Mとなるよう添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mM トリス緩衝液 (pH7.5) 及び1mM EDTA・2Na溶液5ml (各成分の濃度は最終濃度である) を加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0030】(B) 組換え体の創製

上記 (A) 項で得たプレバクテリウム・フラバム MJ-233の全DNA溶液の90μlを制限酵素SalI 50U (units) を用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このSalI分解DNAに、クローニングベクターpUC118 (宝酒造製) を制限酵素SalIで切断した後脱リン酸化処理したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂、及びT4DNAリガーゼ1Uの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、

結合させた。

【0031】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Molec. Biol.)、53、159 (1970)] によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリン 50mgを含む培地 [トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g及び寒天 16gを蒸留水11に溶解] に塗抹した。

【0032】この培地上の生育株を常法 [モレキュラー・クローニング (Molecular cloning)、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを、制限酵素SalIにより切断し、0.7%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。このアガロースゲルよりDNAをナイロン膜に移し取り、エシェリヒア・コリ及びトウモロコシ由来ppc遺伝子の共通領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。用いたプローブは、前記エシェリヒア・コリ及びトウモロコシ由来のppc遺伝子から推定されるアミノ酸配列で特に相同性の高い領域に注目し、そのアミノ酸配列より想定される混合オリゴヌクレオチドプローブをアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製394型DNA/RNAシンセサイザーを用いて合成した。

【0033】実際に用いたプローブの塩基配列は、次の2つのアミノ酸配列：

(1) Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu、(2) Ser Trp Met Gly Gly Asp

より想定される下記の塩基配列：

(1) GTI CTI ACI GCI CAY CCI ACI GAR、(2) TUI TGG ATG GGI GGI GAY

(配列中、RはAまたはG、YはCまたはTを示し、ここでAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、Iはデオキシイノシンを示す。) の24merと18mer (塩基対) である。なお、プローブの合成にあたっては、混合の度合いが著しくなりすぎぬようにデオキシイノシンを用いた。

【0034】合成した上記オリゴヌクレオチドプローブをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造製) を用いる手法で、5'末端リン酸基を[γ-32P]ATPでラジオアイソトープラベルした [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、158、307~315 (1986)]。サザンハイブリダイゼーションは、常法 [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に従って行った。

【0035】この結果、制限酵素SalI分解物の大きさが約3.3kbのDNA断片のみ上記プローブとハイブリダイズすることが判明し、該DNA断片中にppc遺伝子が含まれることが明らかとなった。この大きさが

約3.3kbのDNA断片を保有する本プラスミドをpUC118-ppcと命名した。得られた大きさが3.3kbのDNA断片を各種の制限酵素で切断した時の、制限酵素認識部位数及び切断断片の大きさは前記表1に示した通りであった。このDNA断片の制限酵素切断点*

第2表

| 制限酵素 | 認識部位数 | 切断断片の大きさ (kb) |
|---------|-------|---------------|
| EcoRI | 3 | 0.5、1.4、4.6 |
| HindIII | 2 | 1.6、4.9 |
| KpnI | 1 | 6.5 |

【0037】以上によりppc遺伝子を含む大きさが約3.3kbのDNA断片(SaI断片)を得ることができた。

【0038】実施例2 ppc遺伝子DNAの塩基配列の決定

実施例1の(B)項で得られたppc遺伝子を含む大きさが約3.3kbのDNA断片について、その塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxynucleotide chain termination法) [Sanger, F. et al.、プロシーデフィング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proc. Nat. Acad. Sci. USA)、74、5463 (1977)] により決定した。その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、ppc遺伝子は、後記配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する920のアミノ酸をコードする2760塩基対より構成されていることが判明した。

【0039】実施例3 コリネ型細菌におけるPPC遺伝子産物の発現

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平3-210184号公報に記載の方法に基き次のように調製した。

【0040】半合成培地A培地に、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後記まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液〔25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mM EDTA、50mMグルコース〕20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液〔0.2N NaOH、1% (W/V) SDS〕40mlを添加し、穏やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液〔5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5ml〕30mlを添加し、十分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0041】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得

* 地図を図1に示す。また、上記で得たプラスミドpUC118-ppcを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第2表に示す。

【0036】

【表2】

た。これに等量のフェノール・クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0042】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液〔トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH8に調整〕2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液〔5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液〕15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0043】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜き取ることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソamilアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃で1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0044】プラスミドpHSG298(宝酒造製)0.5μgに制限酵素SaI(5U)を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全分解した。前記で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XhoI(1U)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4DNAリガーゼ1Uになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造

製)を形質転換した。

【0045】形質転換株は30 μ g/ml (最終濃度)のX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g、及び蒸留水 1l、pH 7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、90~91、(1982)参照]により抽出した。このプラスミドを制限酵素EcoRIで切断し、切断断片の大きさを測定した。

【0046】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4kbのDNA断片(複製領域)が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記プラスミドpBY503 DNAを制限酵素KpnIおよびEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片(安定化領域)を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0047】(B) プラスミドpCRY30-ppcの作製及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(B)項で得られたプラスミドpUC118-ppc 5 μ gを制限酵素SalI 5Uを用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、上記(A)項で得られたプラスミドpCRY30 1 μ gを制限酵素XhoI 1Uを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH 7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1Uの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリJM109株を形質転換し、カナマイシン50 μ g/mlを含む培地

〔トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解〕に塗抹した。

【0048】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ

第3表

| 制限酵素 | 認識部位数 | 切断断片の大きさ(kb) |
|-------|-------|--------------|
| EcoRI | 3 | 0.4、3.2、8.4 |
| KpnI | 1 | 12.0 |
| BamHI | 3 | 0.2、1.2、10.6 |

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-ppcと命名した。このプラスミドpCRY30-ppcの制限酵素切断点地図を図2に示す。

* 8. 7kbのDNA断片に加え、大きさ3.3kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。形質転換は、電気パルス法を用いて次の通り行った。

【0049】プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1U/mlになるように添加して、更に2時間振とう培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlの puls 用溶液(272mMショ糖、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH 7.4)にて洗浄した。更に菌体を遠心分離して集め、5mlの puls 用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 μ lとを混合し、水中にて20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 μ g/ml (最終濃度)を含む前記A培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株を得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液〔25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mM EDTA、50mMグルコース〕20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液〔0.2N NaOH、1%(W/V) SDS〕40mlを添加し、穏やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液〔5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5ml〕30mlを添加し、十分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0050】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000 \times gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール・クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000 \times gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000 \times gの遠心分離にかけ、沈澱を回収し、プラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第3表に示す。

【0051】

【表3】

【0052】(C) プラスミドpCRY30-ppcで形質転換されたコリネ型細菌によるppc遺伝子産物(PEPC)の発現

上記(B)項で得られたプラスミドpCRY30-ppcで形質転換されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株を前記A培地100mlにて30℃で24時間振とう培養し、該形質転換株の菌体を得た。培養後の菌体は遠心分離(5,000×g)により回収し、トリス緩衝液(トリス-HCl 100mM、MgSO₄・7H₂O 10mM、ジチオスレイトール 1mM、pH8.5)で洗浄後、超音波破砕器により菌体を破砕した。該菌体破砕液は15,000×gで15分間遠心分離し、得られた上清を更に100,000×gで1時間遠心分離し、粗酵素液とした。

*【0053】得られた粗酵素液につきPEPC活性を測定した。活性測定はリンゴ酸脱水素酵素を共存させ、NADHの減少速度を分光光学的に測定する方法によった〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.)、68、747~750(1970)〕。尚、対照としては、宿主であるブレビバクテリウム・フラバムMJ-233野生株を用い、同様に粗酵素液を調製した。測定結果は、対照菌(野生株)の活性を1とした相対値とし、下記の第4表に示した。

【0054】

*【表4】

第4表

| 菌 株 | PEPC活性 |
|-------|--------|
| 形質転換株 | 6 |
| 野生株 | 1 |

以上より、プラスミドpCRY30-ppcで形質転換された菌株において、PEPCが著量生成されていることが確認された。

【0055】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2760

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：染色体DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum)

20 株名：MJ-233

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1-2760

特徴を決定した方法：E

※

配列

| | |
|---|-----|
| ATG ACT GAT TTT TTA CGC GAT GAC ATC AGG TTC CTC GGT CGA ATC CTC | 48 |
| Met Thr Asp Phe Leu Arg Asp Asp Ile Arg Phe Leu Gly Arg Ile Leu | |
| 1 5 10 15 | |
| GGT GAG GTA ATT GCG GAA CAA GAA GGC CAG GAG GTT TAT GAA CTG GTC | 96 |
| Gly Glu Val Ile Ala Glu Gln Glu Gly Gln Glu Val Tyr Glu Leu Val | |
| 20 25 30 | |
| GAA CAA GCG CGC CTG ACT TCT TTT GAT ATC GCC AAG GGC AAC GCC GAA | 144 |
| Glu Gln Ala Arg Leu Thr Ser Phe Asp Ile Ala Lys Gly Asn Ala Glu | |
| 35 40 45 | |
| ATG GAT AGC CTG GTT CAG GTT TTC GAC GGC ATT ACT CCA GCC AAG GCA | 192 |
| Met Asp Ser Leu Val Gln Val Phe Asp Gly Ile Thr Pro Ala Lys Ala | |
| 50 55 60 | |
| ACA CCG ATT GCT CGC GCA TTT TCC CAC TTC GCT CTG CTG GCT AAC CTG | 240 |
| Thr Pro Ile Ala Arg Ala Phe Ser His Phe Ala Leu Leu Ala Asn Leu | |
| 65 70 75 80 | |
| GCG GAA GAC CTC CAC GAT GAA GAG CTT CGT GAA CAG GCT CTC GAT GCA | 288 |
| Ala Glu Asp Leu His Asp Glu Glu Leu Arg Glu Gln Ala Leu Asp Ala | |
| 85 90 95 | |
| GGC GAC ACC CCT CCG GAC AGC ACT CTT GAT GCC ACC TGG CTG AAA CTC | 336 |
| Gly Asp Thr Pro Pro Asp Ser Thr Leu Asp Ala Thr Trp Leu Lys Leu | |
| 100 105 110 | |
| AAT GAG GGC AAT GTT GGC GCA GAA GCT GTG GCG GAT GTG TTG CGT AAT | 384 |
| Asn Glu Gly Asn Val Gly Ala Glu Ala Val Ala Asp Val Leu Arg Asn | |
| 115 120 125 | |

| 15 | | 16 | |
|---|-----|-----|------|
| GCT GAG GTG GCG CCA GTT CTG ACT GCG CAC CCA ACT GAG ACT CGC CGC | | | 432 |
| Ala Glu Val Ala Pro Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Thr Arg Arg | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| CGC ACT GTT TTT GAT GCG CAA AAG TGG ATC ACC ACC CAC ATG CGT GAA | | | 480 |
| Arg Thr Val Phe Asp Ala Gln Lys Trp Ile Thr Thr His Met Arg Glu | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| CGC CAC GCT TTG CAG TCT GCG GAG CCA ACC GCT CGT ACG CAA AGC AAG | | | 528 |
| Arg His Ala Leu Gln Ser Ala Glu Pro Thr Ala Arg Thr Gln Ser Lys | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| TTG GAT GAG ATC GAA AAG AAC ATC CGC CGT CGC ATC ACC ATT TTG TGG | | | 576 |
| Leu Asp Glu Ile Glu Lys Asn Ile Arg Arg Arg Ile Thr Ile Leu Trp | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| CAG ACC GCG TTG ATT CGT GTG GCC CGC CCA CGT ATC GAG GAC GAG ATC | | | 624 |
| Gln Thr Ala Leu Ile Arg Val Ala Arg Pro Arg Ile Glu Asp Glu Ile | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| GAA GTA GGG CTG CGC TAC TAC AAG CTG AGC CTT TTG GAA GAG ATT CCA | | | 672 |
| Glu Val Gly Leu Arg Tyr Tyr Lys Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ile Pro | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| CGT ATC AAC CGT GAT GTG GCT GTT GAG CTT CGT GAG CGT TTC GGC GAG | | | 720 |
| Arg Ile Asn Arg Asp Val Ala Val Glu Leu Arg Glu Arg Phe Gly Glu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| GAT GTT CCT TTG AAG CCC GTG GTC AAG CCA GGT TCC TGG ATT GGT GGA | | | 768 |
| Asp Val Pro Leu Lys Pro Val Val Lys Pro Gly Ser Trp Ile Gly Gly | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| GAC CAC GAC GGT AAC CCT TAT GTC ACC GCG GAA ACA GTT GAG TAT TCC | | | 816 |
| Asp His Asp Gly Asn Pro Tyr Val Thr Ala Glu Thr Val Glu Tyr Ser | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| ACT CCA CGC GCT GCG GAA ACC GTG CTC AAG TAC TAT GCA CGC CAG CTG | | | 864 |
| Thr Pro Arg Ala Ala Glu Thr Val Leu Lys Tyr Tyr Ala Arg Gln Leu | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| CAT TCC CTC GAG CAT GAG CTC AGC CTG TCG GAC CGC ATG AAT AAG GTC | | | 912 |
| His Ser Leu Glu His Glu Leu Ser Leu Ser Asp Arg Met Asn Lys Val | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| ACC CCG CAG CTG CTT GCG CTG GCA GAT GCC GGG CAC AAC GAC GTG CCA | | | 960 |
| Thr Pro Gln Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ala Gly His Asn Asp Val Pro | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| AGC CGC GTG GAT GAG CCT TAT CGA CGC GCC GTC CAT GGC GTT CGC GGA | | | 1008 |
| Ser Arg Val Asp Glu Pro Tyr Arg Arg Ala Val His Gly Val Arg Gly | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| CGT ATC CTC GCG ACG ACG GCT GAG CTG ATC GGC GAG GAC GCC GTT GAG | | | 1056 |
| Arg Ile Leu Ala Thr Thr Ala Glu Leu Ile Gly Glu Asp Ala Val Glu | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| GGC GTG TGG TTC AAG GTC TTT ACT CCA TAC GCA TCC CCG GAA GAA TTC | | | 1104 |
| Gly Val Trp Phe Lys Val Phe Thr Pro Tyr Ala Ser Pro Glu Glu Phe | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| TTA AAC GAT GCG TTA ACC ATC GAT CAT TCT CTG CGT GAA TCC AAT GAC | | | 1152 |
| Leu Asn Asp Ala Leu Thr Ile Asp His Ser Leu Arg Glu Ser Asn Asp | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| ACT CTC ATC GCC GAT GAT CGT TTG TCT GTG CTG ATT TCT GCC ATC GAG | | | 1200 |
| Thr Leu Ile Ala Asp Asp Arg Leu Val Leu Ile Ser Ala Ile Glu | | | |

| 17 | 18 |
|---|------|
| 385 | 400 |
| AGC TTC GGA TTC AAC CTC TAC TCA CTG GAT CTG CGC CAG AAC TCT GAG | 1248 |
| Ser Phe Gly Phe Asn Leu Tyr Ser Leu Asp Leu Arg Gln Asn Ser Glu | |
| 405 | 415 |
| AGC TAC GAA GAC GTA CTC ACA GAG CTT TTC GAG CGT GCC CAA GTC ACC | 1296 |
| Ser Tyr Glu Asp Val Leu Thr Glu Leu Phe Glu Arg Ala Gln Val Thr | |
| 420 | 430 |
| GCA AAC TAC CGC GAG CTG TCT GAA GAG GAG AAG CTT GAG GTG CTG CTG | 1344 |
| Ala Asn Tyr Arg Glu Leu Ser Glu Glu Glu Lys Leu Glu Val Leu Leu | |
| 435 | 445 |
| AAG GAA CTG CGC AGC CCT CGT CCG TTG ATC CCG CAC GGT TCA GAT GAA | 1392 |
| Lys Glu Leu Arg Ser Pro Arg Pro Leu Ile Pro His Gly Ser Asp Glu | |
| 450 | 460 |
| TAC AGC GAG GTC ACC GAC CGC GAG CTC GGT ATC TTC CGC ACC GCG TCG | 1440 |
| Tyr Ser Glu Val Thr Asp Arg Glu Leu Gly Ile Phe Arg Thr Ala Ser | |
| 465 | 480 |
| GAA GCT GTC AAG AAA TTC GGC CCA CGC ATG GTG CCT CAC TGC ATC ATT | 1488 |
| Glu Ala Val Lys Lys Phe Gly Pro Arg Met Val Pro His Cys Ile Ile | |
| 485 | 495 |
| TCC ATG ACA TCA TCG GTC ACC GAT GTG CTC GAG CCG ATG GTG TTG CTC | 1536 |
| Ser Met Thr Ser Ser Val Thr Asp Val Leu Glu Pro Met Val Leu Leu | |
| 500 | 510 |
| AAA GAA TTC GGC CTC ATC GCG GCC AAC GGC GAC AAT CCA CGC GGC ACC | 1584 |
| Lys Glu Phe Gly Leu Ile Ala Ala Asn Gly Asp Asn Pro Arg Gly Thr | |
| 515 | 525 |
| GTC GAT GTC ATC CCA CTG TTC GAA ACC ATC GAA GAC CTT CGA GCC GGC | 1632 |
| Val Asp Val Ile Pro Leu Phe Glu Thr Ile Glu Asp Leu Arg Ala Gly | |
| 530 | 540 |
| GCC GGA ATC CTC GGC GAA CTG TGG AAA ATT GAT CTC TAC CGC AAC TAC | 1680 |
| Ala Gly Ile Leu Gly Glu Leu Trp Lys Ile Asp Leu Tyr Arg Asn Tyr | |
| 545 | 560 |
| CTC CTG CAG CGC GAC AAC GTC CAG GAA GTC ATG CTC GGC TAC TCC GAT | 1728 |
| Leu Leu Gln Arg Asp Asn Val Gln Glu Val Met Leu Gly Tyr Ser Asp | |
| 565 | 575 |
| TCC AAC AAG GAT GGC GGA TAT TTC TCC GCA AAC TGG GCG CTT TAC GAC | 1776 |
| Ser Asn Lys Asp Gly Gly Tyr Phe Ser Ala Asn Trp Ala Leu Tyr Asp | |
| 580 | 590 |
| GCG GAA CTG CAG CTT GTC GAA CTA TGC CGA TCA GCC GGG GTC AAC GTT | 1824 |
| Ala Glu Leu Gln Leu Val Glu Leu Cys Arg Ser Ala Gly Val Asn Val | |
| 595 | 605 |
| CGC CTG TTC CAC GGC CGC GGT GGC ACC GTT GGA CGT GGT GGC GGA CCT | 1872 |
| Arg Leu Phe His Gly Arg Gly Gly Thr Val Gly Arg Gly Gly Gly Pro | |
| 610 | 620 |
| TCC TAC GAT GCG ATT CTT GCC CAG CCC AAG GGG GCT GTC CAA GGT TCC | 1920 |
| Ser Tyr Asp Ala Ile Leu Ala Gln Pro Lys Gly Ala Val Gln Gly Ser | |
| 625 | 640 |
| GTG CGC ATC ACC GAG CAG GGC GAA ATC ATC TCA GCT AAG TAC GGC AAC | 1968 |
| Val Arg Ile Thr Glu Gln Gly Glu Ile Ile Ser Ala Lys Tyr Gly Asn | |
| 645 | 655 |
| CCT GAA ACT GCG CGC CGA AAC CTC GCG GCA CTG GTC TCA GCC ACG CTT | 2016 |

| 19 | 20 |
|---|--------|
| Pro Glu Thr Ala Arg Arg Asn Leu Glu Ala Leu Val Ser Ala Thr Leu | |
| 660 | 670 |
| GAG GCA TCG CTT CTC GAC GTC TCT GAA CTC ACC GAT CAC CAA CGC GCG | 2064 |
| Glu Ala Ser Leu Leu Asp Val Ser Glu Leu Thr Asp His Gln Arg Ala | |
| 675 | 685 |
| TAT GAC ATC ATG AGT GAG ATC TCT GAG CTC AGC CTG AAG AAG TAC ACC | 2112 |
| Tyr Asp Ile Met Ser Glu Ile Ser Glu Leu Ser Leu Lys Lys Tyr Thr | |
| 690 | 700 |
| TCC TTG GTG CAC GAG GAT CAA GGC TTC ATC GAT TAC TTC ACC CAA TCC | 2160 |
| Ser Leu Val His Glu Asp Gln Gly Phe Ile Asp Tyr Phe Thr Gln Ser | |
| 705 | 720 |
| ACA ACA CTG CAG GAG ATC GGA TCC CTC AAC ATC GGA TCC AGG CCT TCC | 2208 |
| Thr Thr Leu Gln Glu Ile Gly Ser Leu Asn Ile Gly Ser Arg Pro Ser | |
| 725 | 735 |
| TCA CGC AAG CAA ACT TCC TCT GTG GAA GAT TTG CGA GCC ATC CCA TGG | 2256 |
| Ser Arg Lys Gln Thr Ser Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Ile Pro Trp | |
| 740 | 750 |
| GTT CTT AGC TGG TCA CAG TCT CGT GTG ATG CTG CCA GGA TGG TTT GGT | 2304 |
| Val Leu Ser Trp Ser Gln Ser Arg Val Met Leu Pro Gly Trp Phe Gly | |
| 755 | 765 |
| GTC GGA ACG GCA CTT GAA CAG TGG ATT GGA GAA GGG GAG CAA GCT ACC | 2352 |
| Val Gly Thr Ala Leu Glu Gln Trp Ile Gly Glu Gly Glu Gln Ala Thr | |
| 770 | 780 |
| CAG CGC ATC GCC GAG CTG CAA ACA CTC AAC GAG TCC TGG CCA TTT TTC | 2400 |
| Gln Arg Ile Ala Glu Leu Gln Thr Leu Asn Glu Ser Trp Pro Phe Phe | |
| 785 | 800 |
| ACC TCA GTG TTG GAC AAC ATG GCT CAG GTG ATG TCC AAG GCA GAG CTG | 2448 |
| Thr Ser Val Leu Asp Asn Met Ala Gln Val Met Ser Lys Ala Glu Leu | |
| 805 | 815 |
| CGT TTG GCA AAG CTC TAT GCA GAC CTC ATC CCA GAT AGG GAA GTC GCC | 2496 |
| Arg Leu Ala Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Ile Pro Asp Arg Glu Val Ala | |
| 820 | 830 |
| GAG CGC GTC TAT TCC GTC ATC CAC GAG GAA TAT TTC CTG ACT AAA AAG | 2544 |
| Glu Arg Val Tyr Ser Val Ile His Glu Glu Tyr Phe Leu Thr Lys Lys | |
| 835 | 845 |
| ATG TTC TGC GTG ATC ACC GGC TCC GAT GAT CTC CTT GAT GAC AAC CCA | 2592 |
| Met Phe Cys Val Ile Thr Gly Ser Asp Asp Leu Leu Asp Asp Asn Pro | |
| 850 | 860 |
| CTT CTG GCA CGC TCT GTC CAG CGT CGT TAC CCC TAC CTG CTT CCA CTC | 2640 |
| Leu Leu Ala Arg Ser Val Gln Arg Arg Tyr Pro Tyr Leu Leu Pro Leu | |
| 865 | 880 |
| AAT GTG ATC CAG GTA GAG ATG ATG CGA CGC TAC CGA AAA GGC GAC CAA | 2688 |
| Asn Val Ile Gln Val Glu Met Met Arg Arg Tyr Arg Lys Gly Asp Gln | |
| 885 | 895 |
| AGC GAG CAA GTG TCC CGC AAT ATT CAG CTG ACA ATG AAC GGT CTT TCC | 2736 |
| Ser Glu Gln Val Ser Arg Asn Ile Gln Leu Thr Met Asn Gly Leu Ser | |
| 900 | 910 |
| ACT GCA CTG CGC AAC TCC GGC TAG | 2760 |
| Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly *** | |
| 915 | 920 50 |

【0056】

【発明の効果】本発明により、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233由来の有用物質生産及び二酸化炭素固定に関与するホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子 (ppc 遺伝子) を含むDNA断片が提供される。

【0057】本発明のDNA断片を組み込んだ形質転換株は、ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) 活性が向上しており、本菌体あるいは本菌から調製したPEPCを利用することにより、アミノ酸等の*10

【図1】



* 有用物質生産効率が向上することが期待される。

【0058】

【図面の簡単な説明】

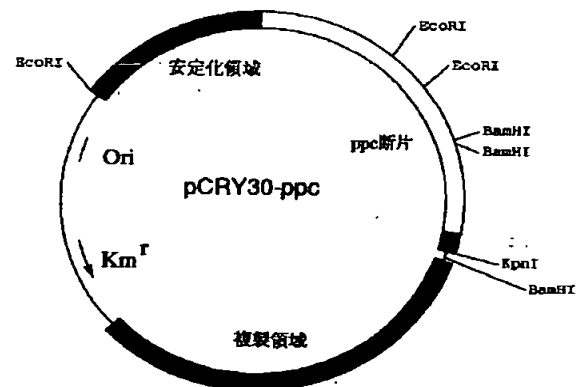
【0059】

【図1】本発明の大きさが約3.3kbのppc遺伝子を含むDNA断片の制限酵素切断点地図。

【0060】

【図2】本発明のプラスミドpCRY30-ppcの制限酵素切断点地図。

【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:13)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(72) 発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

※

※ (72) 発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内